



18 JUL. 2000

FR 00/1712
EU

REC'D 02 AUG 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **27 JUIN 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITE
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis. rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **22 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907943**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **22 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet DAWIDOWICZ
18 boulevard Pereire
75017 PARIS

n° du pouvoir permanent **BF 7441** références du correspondant **0140539757** téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle
☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale
☐ brevet d'invention

Établissement du rapport de recherche ☒ différé ☐ immédiat
Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)
Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe de référence.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN
Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination
EUROFINS SCIENTIFIC

code APE-NAF

Forme juridique
Société Anonyme

Nationalité (s) **Française**
Adresse (s) complète (s)
Site de la Géraudière
Rue Pierre Adolphe Bobierre
BP 42301 NANTES Cedex

Pays

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE
pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DMSIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)
DAWIDOWICZ Armand 92/1065

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BF 7441	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 07943	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe de référence			
LE(S) DEMANDEUR(S) : EUROFINS SCIENTIFIC			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MARTIN	
Prénoms		Gérard	
Adresse	Rue	21 rue Thomas Maisonneuve	
	Code postal et ville	44000	NANTES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MARTIN	
Prénoms		Gilles	
Adresse	Rue	Bücher Hauptstrasse 25	
	Code postal et ville	90427	NÜRNBERG - ALLEMAGNE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
DAWIDOWICZ Armand 92/1065			

5

10

15 Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe
par rapport à un lot de la même molécule complexe de
référence

La présente invention concerne un procédé d'analyse d'un
20 échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de
la même molécule complexe de référence, en vue notamment de
la détermination de leur degré de similitude et/ou de la
caractérisation de leur procédé de fabrication.

25 La contrefaçon de produits complexes est devenue un
véritable fléau, en particulier dans les industries de la
chimie fine, de la cosmétique et de la pharmacie. La
détection des contrefaçons de produits complexes par
analyse physico-chimique est souvent fondée sur l'analyse
30 des traces de produits secondaires de la synthèse, de
catalyseurs ou d'impuretés. Par exemple, il a été constaté
par analyse chromatographique en phase liquide (Asakawa,
Shuichi; Kato, Koichi; Inoma, SusumuHakodate Customs
Laboratory, Hakodate-shi, 040, Japan , Kanzei Chuo
35 Bunsekishoho (1997), 36, 37-43) que certains herbicides à
base de glyphosate, fabriqués aux Etats-Unis et importés au
Japon, transgressaient des brevets japonais. En utilisant
aussi une technique de chromatographie en phase gazeuse

couplée à la spectrométrie de masse, E.Charton, M.Wierer, J.M. Spieser, A. Van Dorsselaer, et G.Rautmann (European Department for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, F-67029, Pharm. Pharmacol. Commun. (1999), 5(1), 61-66) ont pu mettre en évidence une contrefaçon d'un médicament, la somatropine, décrit dans la pharmacopée Européenne, qui était en fait un produit dérivé de la somatropine d'origine humaine. Des méthodes chimiques conventionnelles ont permis de prouver que des comprimés d'une substance narcotique, la fenethylline, avaient été préparés par détournement d'un brevet allemand (N. Al-Gharably et A.R. Al-Obaid, College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, 11451, Saudi Arabia, J. Forensic Sci. Soc. (1994), 34(3), 165-7). De même des contrefaçons d'antibiotiques de la série des β - lactames ont été étudiées par électrophorèse capillaire, au "National Forensic Chemistry Center" de la "US Food and Drug Administration", 1141 Central Parkway, Cincinnati, OH, 45202, USA et décrites dans le Journal of Chromatography., A (1994), 674(1-2), 153-63.

Ces méthodes compositionnelles ne sont pas toujours efficaces et elles peuvent révéler des faux-positifs. De plus, elles ne peuvent pas être mises en oeuvre dans tous les cas en raison de l'absence de traceurs caractéristiques.

Parallèlement, des techniques d'analyse plus puissantes ont été développées. Tel est le cas de la technique de spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI). Ainsi, il est possible de caractériser le fractionnement isotopique naturel spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire (méthode RMN-FINS) en mesurant les teneurs isotopiques sur plusieurs sites moléculaires (voire tous les sites) d'une molécule. Toutefois, cette technique n'est à ce jour utilisée que pour des molécules simples pouvant être directement analysées.

Un but de la présente invention est de proposer un procédé d'analyse de molécules complexes basé sur une méthodologie originale de mise en oeuvre des techniques isotopiques en
5 abondance naturelle.

Un autre but de la présente invention est de proposer un procédé d'analyse de molécules complexes permettant de différencier un lot de molécules complexes par rapport à un
10 autre lot et d'établir à posteriori l'historique du procédé de fabrication d'une telle molécule complexe.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un
15 lot de la même molécule complexe de référence en vue notamment de la détermination de leur degré de similitude et/ou de la caractérisation de leur procédé de fabrication, caractérisé en ce qu'on scinde la molécule complexe en au moins deux sous-entités moléculaires, en ce que, si
20 nécessaire, on scinde au moins l'un des produits de scission en au moins deux nouvelles sous entités moléculaires et en ce qu'on répète cette opération de scission sur au moins une partie des produits de scission jusqu'à obtention de sous entités moléculaires analysables,
25 en ce qu'on détermine, en fonction des sites atomiques des produits de scission concernés par les réactions de scission, le ou les isotopes à étudier, en ce qu'on établit, pour au moins une partie des produits de scission, leur profil isotopique et en ce qu'on compare le profil
30 isotopique des produits de scission au profil isotopique de matière(s) première(s) déjà répertoriée(s) et intervenant dans le procédé de synthèse de la molécule complexe de référence et/ou au profil isotopique de produits de scission de la molécule complexe de référence soumise aux
35 mêmes réactions de scission.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention, à partir du ou des isotopes sélectionnés, on établit le

profil isotopique d'au moins une partie des produits de scission par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI) pour la mesure de la teneur isotopique globale et/ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) pour la mesure de la teneur isotopique spécifique positionnelle.

L'invention repose sur la constatation suivante de ses inventeurs. La pluparts des molécules organiques sont obtenues au moyen d'une séquence réactionnelle comportant un nombre d'étapes qui peut souvent être important quand la complexité de la molécule s'accroît. Chacune de ces étapes est caractérisée par des effets isotopiques cinétiques (et/ou thermodynamiques) qui provoquent un fractionnement isotopique spécifique, c'est-à-dire un marquage isotopique sélectif, sur les sites atomiques (H, C, N, O...) directement impliqués dans la réaction ou situés au voisinage immédiat des sites réactionnels. Il est ainsi possible d'établir une carte de distribution isotopique d'une molécule complexe à partir des profils isotopiques des différentes étapes mises en jeu. L'influence des matières premières et des réactifs intermédiaires susceptibles d'être utilisés est également prise en compte pour l'établissement du profil isotopique de la molécule fondé sur les profils individuels d'un nombre plus ou moins grand de ses fragments constitutifs.

La démarche d'authentification s'établit ainsi :
Sur un échantillon de produit authentique P_0 constituant la molécule complexe de référence, on réalise une réaction de coupure sélective de la molécule en au moins deux sous-entités moléculaires P_{-1a} et P_{-1b} plus légères. Les effets isotopiques associés à cette réaction de coupure sont déterminés. Les compositions isotopiques spécifiques de P_{-1a} et P_{-1b} sont ainsi univoquement reliées à celle de P_0 . Les paramètres isotopiques spécifiques des sites moléculaires des fragments sont mesurés par la méthode SNIF-NMR (^2H , ^{13}C , ^{15}N). Une mesure des teneurs isotopiques globales par spectrométrie de masse isotopique (SMRI) peut

aussi être réalisée (^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{15}N , ^{34}S). La sélection des isotopes à analyser est opérée sur la base des données de référence et des caractéristiques spectroscopiques du fragment. Dans de nombreux cas la mesure SNIF- NMR de ^2H 5 suffit à la caractérisation.

... si les fragments P_{-1} présentent encore une taille moléculaire incompatible avec une étude directe par SNIF-NMR, on recommence cette séquence d'analyse à partir de P_{-1} 10 1(a ou b) vers P_{-2} (a ou b) et ainsi de suite jusqu'à obtention de molécules généralement utilisées comme matières premières ou intermédiaires de synthèse dans l'industrie organique.

15 La même étude est ensuite réalisée, strictement dans les mêmes conditions expérimentales, sur la molécule complexe à analyser constituée par exemple d'un produit suspecté d'être une contrefaçon ou le résultat d'une copie illicite de brevet. La comparaison des résultats obtenus dans les 20 deux études permet d'établir une conclusion irréfutable sur la conformité ou la non-conformité du produit et des procédés mis en oeuvre. Ces deux étapes à la base du procédé suffisent pour répondre à la question : conforme ou non conforme ?.

25

Abstraction faite des effets isotopiques de réaction, les paramètres isotopiques des fragments P_i déterminés à partir de la démarche d'authentification ci-dessus sont représentatifs de molécules relativement simples qui sont 30 fréquemment des intermédiaires de la synthèse industrielle du médicament ou du produit actif concerné. Ces paramètres constituent donc des indicateurs fiables des éléments de base utilisés par la firme productrice et peuvent faire l'objet d'une exploitation plus poussée. En cas de non 35 conformité, ils permettent, en se référant aux données sur les molécules de taille modeste éventuellement déjà répertoriées, de caractériser l'origine des matières premières du produit contrefait. On conclut alors, non

seulement que le produit n'est pas conforme mais qu'il a été préparé par tel procédé répertorié ou à partir de telle matière première répertoriée. Le procédé d'analyse décrit ci-dessus permet donc éventuellement d'identifier le
5 procédé de fabrication mis en oeuvre par la fabrication d'une molécule complexe non authentique.

Par ailleurs, le fabricant désireux d'authentifier ultérieurement son médicament ou produit actif, même non
10 protégé par un brevet, peut introduire dans sa chaîne de production un ou plusieurs intermédiaires de synthèse, correspondant à un ou plusieurs fragments P_i possédant un profil isotopique qui lui soit propre. Cette méthode crée en fait un marquage du produit sans qu'il soit besoin
15 d'ajouter un élément exogène de marquage (comme ceci est le cas lors d'une utilisation de composés marqueurs particuliers, de métaux traces, ou de produits enrichis en isotopes lourds tels que ^{13}C). Une empreinte isotopique spécifique pourra être conférée à l'intermédiaire de
20 synthèse (molécule de taille modeste elle-même synthétisée à partir de dérivés du pétrole ou extraite de matières végétales, etc.), soit en sélectionnant des matières premières initiales de teneur isotopique particulière et constante, soit en agissant sur les effets isotopiques
25 associés aux réactions de préparation, d'extraction, de purification de l'intermédiaire correspondant à P_i . En présence d'effets isotopiques cinétiques, une variation du rendement par exemple peut suffire à modifier le fractionnement et donc le profil isotopique de
30 l'intermédiaire de synthèse. En appliquant le procédé d'analyse ci-dessus à la molécule complexe ainsi élaborée, on obtiendra un ou des fragments P_i auquel un profil isotopique unique a été conféré. La firme disposera donc de paramètres isotopiques d'un ou plusieurs fragments de son
35 produit qui lui seront propres. Dans cette stratégie, le produit ne souffre pas des réserves qui s'attachent à l'adjonction d'éléments exogènes ou à l'enrichissement par marquage isotopique. Lors du contrôle, le produit suspect

est étudié dans les conditions décrites ci-dessus et l'interprétation est faite de la même façon par comparaison des paramètres des fragments du produit suspect et du produit de référence. Dans ce cas, le contrôle peut être
5 simplifié puisqu'il suffit de caractériser le ou les fragments typiques. Dans cette démarche, le fabricant dispose d'une méthode pratiquement incontournable de caractérisation de son produit et même de caractérisation de ses lots puisqu'il lui suffit de changer la source d'une
10 matière première ou les conditions de la synthèse d'un fragment pour conférer à Pi un profil typique.

En résumé, dans le cadre du procédé d'analyse décrit ci-dessus, il est possible, lors de la fabrication de la
15 molécule complexe de référence devant être soumise aux mêmes réactions de scission que la molécule complexe à analyser, de sélectionner au moins une matière première et/ou un produit intermédiaire et/ou des conditions de synthèse de manière à conférer à au moins l'un des produits
20 de scission de la molécule complexe de référence, appelé Pi, ci-dessus un caractère unique détectable lors de l'analyse sans enrichissement par marquage isotopique et/ou adjonction d'éléments exogènes.

25 Il est à noter que les fragments ou sous-unités moléculaires sont obtenus par des voies de dégradation chimique appropriées telles qu'elles sont décrites dans l'exemple d'application. Les fragments sont ensuite séparés et purifiés par différentes techniques, comme par exemple
30 la chromatographie en phase liquide, en phase gazeuse ou sur gel de silice, la distillation, la recristallisation, etc. Les protocoles d'extraction et de purification sont préalablement soigneusement étalonnés pour éviter tout fractionnement isotopique incontrôlé.

35

Un exemple d'analyse du procédé de fabrication d'une molécule complexe est décrit ci-dessous.

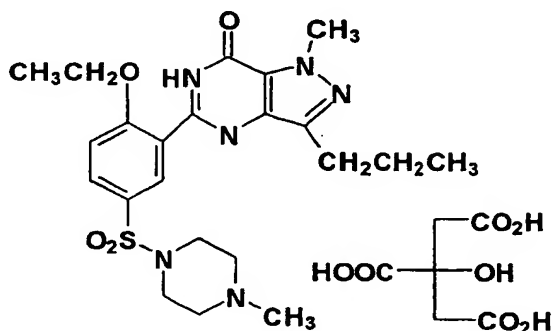
a)Description de la molécule à analyser :

A titre d'illustration du procédé, considérons le cas du
citrate de sildenafil [VIAGRA (marque déposée)] fabriqué
par Pfizer) appartenant à la catégorie des agents
5 antianginaux du type pyrazolopyrimidinone.

Le citrate de sildenafil possède la structure chimique
suivante :



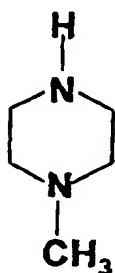
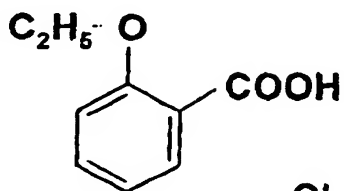
10



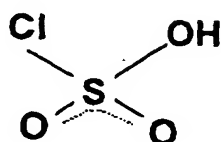
15 1-[4-éthoxy-3-(6,7-dihydro-1-méthyl-7-oxo-3-propyl-1 H-
pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)
phénylsulphonyl]-4-méthylpipérazine citrate

Cette molécule peut être découpée en plusieurs fragments moléculaires portant un message isotopique caractéristique, dénommés « synthons isotopiques »

Dérivé salicyllique

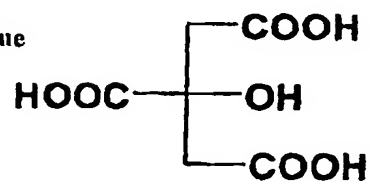
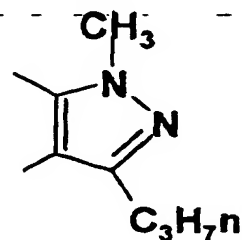


méthylpipérazine



Acide chlorosulfonique

1H-pyrazole substitué



acide citrique

6



Occurrence et méthodes de synthèse envisageables pour les matières premières P-1b, P-2b, P-4a1, P-4a2 et P-4b:

5 P-1b : N-méthylpipérazine $C_5H_{12}N_2$ M= 100,16 CAS 109-01-3

P-2b : acide-chloro-
sulfonique SO_3HCl M= 116,52 CAS 7790-94-5

10 P-4a1 et P-4a2 : 1H-pyrazole, 1-méthyl, 3-n propyl, 4-amino, 5-cyano ou acétamido

$C_8H_{12}N_4$ ou $C_8H_{14}N_4O$

La synthèse du cycle 1H-pyrazole substitué peut se faire par l'intermédiaire d'une réaction de cyclisation en
15 hydrazone à partir d'acylacétate d'éthyle et addition nucléophile de l'ion CN^- sur le carbonyle de l'hydrazone cyclique.

P-4b : acide-2-éthoxy
20 benzoïque $C_9H_{10}O_3$ M= 166.18 CAS 134-11-2

Les matières premières P-1b, P-2b et P-4b peuvent se trouver dans le commerce mais il est intéressant de préparer P-4a1 et P-4a2 au moyen des synthèses
25 conventionnelles des cycles 1H- pyrazole. Ces synthèses font généralement appel à des hydrazines substituées du type $R_1-NH-NH_2$ et des composés α -dicarboxylés $R_3-CO-CH_2-CO-R_4$.

30 Les teneurs isotopiques des matières premières utilisables sont bien documentées dans la littérature.

Les rapports isotopiques $R(i)$ sont exprimés en déviations $\delta(i)$ ‰ par rapport à une référence internationale $R(ref)$
35 au moyen de la relation :

$$\delta(i) = ((R(i)/R(ref))-1)*1000 \text{ ‰}$$

^2H et ^{18}O : V.SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)

^{13}C : V.PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)

^{15}N : azote atmosphérique

^{34}S : CDT, échantillon de Troilite extrait du Canyon Diablo

5 (USA)

Les cycles benzéniques d'origine fossile (pétrole) sont caractérisés par des valeurs δ ^2H comprises entre -20 et -120 ‰ et les chaînes latérale saturées entre 0 et -70 ‰. Les mesures sont réalisées par RMN (SNIF-NMR) pour les chaînes latérales et la teneur globale par Spectrométrie de Masse (SMRI). Les teneurs globales en ^{13}C mesurées par SMRI sont généralement égales à -28.5 ‰ avec un écart type de l'ordre de 2 ‰ et les teneurs isotopiques en ^{13}C des chaînes latérales alkylées ou fonctionnelles sont mesurées par RMN. Selon le procédé de synthèse et l'origine de la matière première des chaînes latérales, les valeurs δ ^{13}C peuvent varier entre -5 et -100 ‰ et offrent ainsi un potentiel de caractérisation important.

20

Les molécules azotées d'origine synthétique ont des valeurs ^{13}C et ^{15}N , mesurées par SMRI, relativement faibles et égales respectivement à -30 ‰ (1.5) et -20 ‰ (10) mais, dans ce dernier cas, les réactions de cyclisation en pyrazoles et xanthines induisent des appauvrissements sensibles en isotopes lourds. A ce niveau, on peut considérer que les valeurs δ ^{15}N du groupe CN ou du groupe CONH₂ reflètent celles des matières premières car l'introduction dans le motif 1H-pyrazole se fait sans fractionnement isotopique significatif. La teneur en ^{15}N du groupe NH₂ est d'autant plus faible par rapport à celle de la matière première que le rendement de la réaction est faible.

35 Les acides chlorosulfoniques commerciaux sont généralement issus de l'acide sulfurique dont la teneur en ^{34}S peut

varier entre -25 et +25 ‰ selon l'origine de la matière premières (S natif, pyrites) et du procédé de fabrication. Cependant, une fois synthétisé, le groupe $-SO_2-$ est un excellent traceur naturel et la teneur en ^{34}S est
 5 déterminée par SMRI.

Enfin, il est intéressant de noter que la cartographie isotopique de l'acide citrique est très bien définie et que l'origine du citrate de sildenafil peut être précisée par
 10 la considération de la distribution isotopique dans le fragment citrate. Ainsi, la teneur en 2H mesurée par RMN varie entre -40 à -80 ‰ pour des acides citriques biotechnologiques mais les valeurs $\delta^{13}C$ sont égales respectivement à -11 ‰ (1) ou -25 ‰ (1) selon que la
 15 matière première est constituée par un sucre C34 ou C3. Les acides citriques naturels extraits de fruits tels que les citrus, ananas ou fruits rouges ont des valeurs δ^2H très voisines de 0 ‰ (25).

20 Les gammes de variations que nous venons de situer prouvent la faisabilité de la démarche de protection d'un médicament ou produit actif. Une large possibilité de choix de valeurs isotopiques d'un (ou plusieurs) fragment(s) est offerte à la firme productrice souhaitant réaliser un « marquage
 25 naturel » de son produit.

d) Caractérisation des différentes étapes réactionnelles par l'établissement d'un profil de fractionnement isotopique :

30 ■ Etape : niveau -4 ---> niveau -3

Aucune modification des teneurs 2H et ^{13}C du cycle benzénique n'est attendue et, de la même façon, la valeur $\delta^{18}O$ du groupe éthoxy ne doit pas varier. La variation la plus significative se situe au niveau de la
 35 fonction NH_2 de P(-4a) qui subit un fractionnement isotopique $^{15}N/^{14}N$ proportionnel à l'effet cinétique α de

la réaction de formation de la liaison amide et le fractionnement correspondant est mesuré par SMRI.

Il est à noter toutefois que la matière première P(-4b), acide éthoxy-2 benzoïque, peut être marquée naturellement et spécifiquement sans ajout de molécules enrichies de la façon suivante :

Le groupe $\text{O-C}_2\text{H}_5$ est marqué naturellement en ^2H , ^{13}C ou ^{18}O à partir de molécules d'éthanol convenablement choisies. Un éthanol de synthèse présente des teneurs en ^2H égales respectivement à -100 et -160 ‰ sur les deux sites CH_3 et CH_2 avec des teneurs ^{13}C de l'ordre de -28 à -31 ‰ et des teneurs ^{18}O égales à -5-10 ‰. Par ailleurs, un éthanol naturel pourra présenter des teneurs en ^2H , ^{13}C , ou ^{18}O respectivement égales à -200 et -400 ‰ (^2H), -11 ‰ (^{13}C) et +7/+10 (^{18}O). Ces deux types de groupe éthoxy disponibles commercialement sans ajouts enrichis sont facilement introduits dans la molécule d'acide o-hydroxybenzoïque au moyen de réactions conventionnelles pour former la matière première P(-4b). Les caractéristiques isotopiques de cette matière première, qui devient un fragment typique tel que décrit ci-dessus, se retrouvent dans la molécule finale de citrate de sildenafil.

▪ Etape : niveau -3 ---> niveau -2

Au cours de cette étape, on peut observer par SMRI des variations caractéristiques des teneurs

$\delta^{15}\text{N}$ des atomes d'azote du cycle pyrimidinone .

30 Les valeurs $\delta^{2\text{H}}$ et $\delta^{18}\text{O}$ des sites NH et C=O ne sont pas exploitables car elles dépendent des échanges chimiques avec le milieu.

▪ Etape : niveau -2 ---> niveau -1

35 Au cours de cette étape réactionnelle, le cycle benzénique est sulfoné au moyen d'une réaction du type

substitution électrophile à basse température .La teneur en ^{34}S mesurée par SMRI peut être très légèrement modifiée, mais cette modification est d'autant plus faible que le rendement de la sulfonation est élevé.

5 Aucune modification n'est attendue pour les autres isotopomères de P(-1a).

▪ Etape : niveau -1 ---> niveau 0

10 La fixation du cycle piperazine de (P-1b) sur le groupe sulfonyle de P(-1a) peut provoquer un faible appauvrissement en ^{15}N du fragment pipérazine fixé au citrate de sildanefil .Cet appauvrissement, qui est mesuré par SMRI, peut être éventuellement caractérisé sur le produit de coupure du citrate de sildanefil. Les
15 autres teneurs isotopiques ne sont pas altérées au cours de cette étape.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'analyse d'un échantillon d'une molécule complexe par rapport à un lot de la même molécule complexe de référence en vue notamment de la détermination de leur degré de similitude et/ou de la caractérisation de leur procédé de fabrication, caractérisé en ce qu'on scinde la molécule complexe en au moins deux sous-entités moléculaires, en ce que, si nécessaire, on scinde au moins l'un des produits de scission en au moins deux nouvelles sous-entités moléculaires et en ce qu'on répète cette opération de scission sur au moins une partie des produits de scission jusqu'à obtention de sous-entités moléculaires analysables, en ce qu'on détermine, en fonction des sites atomiques des produits de scission concernés par les réactions de scission, le ou les isotopes à étudier, en ce qu'on établit, pour au moins une partie des produits de scission, leur profil isotopique et en ce qu'on compare le profil isotopique des produits de scission au profil isotopique de matière(s) première(s) déjà répertoriée(s) et intervenant dans le procédé de synthèse de la molécule complexe de référence et/ou au profil isotopique de produits de scission de la molécule complexe de référence soumise aux mêmes réactions de scission.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, à partir du ou des isotopes sélectionnés, on établit le profil isotopique d'au moins une partie des produits de scission par spectrométrie de masse des rapports isotopiques pour la mesure de la teneur isotopique globale et/ou par résonance magnétique nucléaire RMN pour la mesure de la teneur isotopique spécifique positionnelle.

35

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que, lors de la fabrication de la molécule complexe de référence devant être soumise aux

mêmes réactions de scission que la molécule complexe à analyser, on sélectionne au moins une matière première et/ou un produit intermédiaire et/ou des conditions de synthèse de manière à conférer à au moins l'un des produits de scission de la molécule complexe de référence un caractère unique détectable lors de l'analyse sans enrichissement par marquage isotopique et/ou adjonction d'éléments exogènes.

